

Научная статья

УДК 630.161:631.52:57.085.23
DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.06

Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор)

Олег Михайлович Корчагин¹
кандидат биологических наук

Татьяна Михайловна Табацкая²

Ольга Сергеевна Машкина³
кандидат биологических наук

Аннотация. Рассматриваются возможности и преимущества использования коллекции *in vitro* для сохранения (консервации *ex situ*) и воспроизводства представителей ценного генофонда лиственных древесных пород, проведения прикладных и фундаментальных исследований. Приведена методология формирования и длительного поддержания (от 1 года до 30 лет) живой коллекции *in vitro* (в виде микрорастений) ценных генотипов березы, тополя, осины и ивы. Показано, что применение питательных сред без гормонов при многолетнем хранении образцов обеспечивает сохранение их жизне- и регенерационной способности, генетических и селекционных (при высадке растений в почву) особенностей материнских деревьев. Выращивание посадочного материала на основе коллекции *in vitro* позволяет снизить сроки и себестоимость его получения (за счет упрощения и исключения отдельных этапов клонального микроразмножения), повысить эффективность получения качественных саженцев для создания лесных культур целевого назначения (за счет селективного тиражирования генотипов с заданными характеристиками). Представлены данные по использованию коллекции *in vitro* как генетического ресурса (виды, разновидности, гибриды, сорта; всего 21 вид, 88 генотипов) для проведения исследований по тканевой и клеточной селекции *in vitro* с целью получения солеустойчивых клонов древесных видов, изучения генетики морфогенеза (в частности, рассеченного листа березы). Обсуждаются проблемы взаимодействия между институтами, имеющими подобные коллекции. Их успешное решение будет способствовать повышению доступности и востребованности коллекций *in vitro*, расширению их функций, более быстрому внедрению полученных результатов в практику лесного хозяйства.

Ключевые слова: коллекция клонов *in vitro*, генетические ресурсы, лиственные древесные растения, питательные среды без гормонов, посадочный материал.

Для цитирования: Корчагин О.М., Табацкая Т.М., Машкина О.С. Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор). – Текст : электронный // Лесохозяйственная информация. 2023. № 2. С. 75–90. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.06.

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, директор (Воронеж, Российская Федерация), omkorchagin@mail.ru

² Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, старший научный сотрудник (Воронеж, Российская Федерация), tatyana.tabacky@gmail.com

³ Воронежский государственный университет, доцент; Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, зав. лабораторией биотехнологии (Воронеж, Российская Федерация), mashkinaos@mail.ru

Original article

DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.06

Conservation of Forest Genetic Resources by the *in vitro* Collection: Status, Prospects, Problems (Analytical Review)

Oleg M. Korchagin¹

Candidate of Biological Sciences

Tatiana M. Tabatskaya²**Olga S. Mashkina**³

Candidate of Biological Sciences

Abstract. The paper discusses the possibilities and advantages of use of the *in vitro* collection for conservation (*ex situ*) and reproduction of representatives of valuable deciduous woody plants gene pool, and also for the conduct of fundamental and applied scientific research. The paper shows the methodology of creation and long-term (from 1 to 30 years) *in vitro* storage of a living collection of micro-plants, that includes valuable genotypes of birch, poplar, aspen and willow. It has shown that the use of hormone-free media in long-term storage of samples ensures the preservation of their viability and regenerative capacity, as well as the preservation of genetic traits and breeding characteristics of parent trees (at the stage of transplantation of plants in the soil). The cultivation of planting material which is based on the *in vitro* collection allows plant breeders to reduce the production costs and the time needed as a result of simplification of the process and exclusion of some individual stages of clonal micro-propagation. It also makes production of high-quality seedlings more efficient and thereby improves efficiency of the creation of purpose-oriented forest plantations through selective replication of genotypes with specified characteristics. The study provides data on the use of the *in vitro* collection as a genetic resource (species, varieties, subvarieties, hybrids, 21 species and 88 genotypes in total) for researches on cell and tissue *in vitro* selection with a view to obtaining salt-resistant clones of woody species, for researches on genetics of morphogenesis (in particular, dissected birch leaf). Finally, there is an overview of the problems of interaction between institutions with similar collections. The solution to these problems should improve the availability and relevance of *in vitro* collections, expand their functions, and ensure rapid implementation of the results into forestry practice.

Key words: *in vitro* clone collection, genetic resources, deciduous woody plants, hormone-free nutrient media, planting material.

For citation: Korchagin O., Tabatskaya T., Mashkina O. Conservation of Forest Genetic Resources by the *in vitro* Collection: Status, Prospects, Problems (Analytical Review). – Text : electronic // Forestry information. 2023. № 2. P. 75–90. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.06.

¹ All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Director (Voronezh, Russian Federation), omkorchagin@mail.ru

² All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Senior Researcher (Voronezh, Russian Federation), tatyana.tabacky@gmail.com

³ Voronezh State University, Associate Professor; All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Head of the Laboratory of Biotechnology (Voronezh, Russian Federation), mashkinaos@mail.ru

Введение

Коллекции *in vitro* (биоресурсные коллекции) – это искусственно созданные и длительно поддерживаемые в контролируемых асептических условиях (*in vitro*) образцы живого растительного материала (меристемы, каллуса, эмбриогенных культур, микропобегов, целых микрорастений и др.), соответствующие конкретным генотипам разных видов растений, которые предназначены для их сохранения и воспроизводства. В коллекции *in vitro*, как правило, сохраняют уникальные и/или хозяйственно ценные генотипы, редкие и исчезающие виды растений, преимущественно те, которые трудно размножаются вегетативно или теряют ценные признаки при семенном размножении [1–3]. Такие «живые» коллекции (включающие уникальные образцы генетических ресурсов и чаще всего организованные при ботанических садах, научно-исследовательских институтах и университетах) представляют собой только часть генетического разнообразия, однако особо ценную для сохранения (консервации *ex situ*) и воспроизводства, всестороннего изучения и использования.

Создание и поддержание коллекций представителей ценного генофонда относится к приоритетным направлениям в нашей стране, что отражено в ряде стратегических документов Российской Федерации, последним из которых является Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 гг. [4]. Один из запланированных результатов данной программы – создание и функционирование биоресурсных коллекций (включая национальные биоресурсные центры), обеспечивающих хранение и предоставление образцов коллекций в соответствии с мировыми стандартами [4].

В настоящее время в России зарегистрировано около 250 коллекций – растений (82 коллекции), микроорганизмов (44 коллекции), животных (32 коллекции), биоматериалов и клеточных линий человека (15 коллекций) и других живых объектов, а также гербарных

и музейных коллекций (63) [3, 5, 6]. К наиболее крупным из них, не только в России, но и в мире, относится коллекция генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей Всероссийского института генетических растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) (Санкт-Петербург). В коллекции насчитывается более 320 тыс. образцов, хранящихся в виде семян, вегетативных и генеративных органов, культуры тканей (*in vitro*) в контролируемых условиях при различных температурных режимах [3]. В 2022 г. Указом Президента РФ на базе ФИЦ ВИР им. Н.И. Вавилова был организован Национальный биоресурсный центр генетических ресурсов растений [7], одной из задач которого является формирование первого полного Национального каталога особо ценных образцов генетических ресурсов растений. Это важный шаг на пути к интеграции информации о коллекциях растений нашей страны для их сохранения, развития и использования по сетевому принципу.

Создание и длительное поддержание коллекций *in vitro* ценных генотипов многолетних лесных древесных растений особенно актуально потому, что это связано не только с обеднением и сокращением генофонда лесов из-за лесных пожаров, глобального изменения климата (в том числе засухи), техногенного загрязнения и других причин, но и со сложностью самого объекта. Сложность обусловлена трудностью черенкования многих древесных видов и пород, снижением у взрослых деревьев (прошедших селекционную оценку) регенерационной активности тканей, высокой зараженностью (бактериальной и грибковой) исходного материала, что затрудняет его введение в культуру *in vitro*. В условиях же *in vitro* миниатюрные растения, их отдельные органы и ткани хранятся в строго контролируемых условиях, являются омоложенными образцами (копиями) взрослых деревьев, сохраняющими регенерационную способность на достаточно высоком уровне. При этом большое значение имеет разработка регламентов и технологий культивирования *in vitro*, обеспечивающих надежное хранение образцов с сохранением их жизненной и регенерационной способности, генетической

и хозяйственной ценности материнских деревьев. Это во многом зависит от видовых и генотипических особенностей коллекционного материала,

условий его хранения *in vitro* и других факторов, которые необходимо учитывать при создании коллекции и ее долговременном поддержании.

Коллекцию *in vitro* клонов ценных генотипов лиственных древесных растений в ФГБУ ВНИИЛ-ГИСбиотех начали формировать (в виде микро-растений) с 1991 г., она является одной из самых старейших в России [8]. Длительность хранения образцов взрослых деревьев составляет от 1 года до 30 лет. В 2018 г. коллекция зарегистрирована как уникальная научная установка (УНУ) на сайте «Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации» (регистрационный номер 569228)¹. В состав коллекции входят 88 клонов (генотипов), которые представлены гибридами, сортами, видами и разновидностями, относящимися к 21 виду, 3 родам, 2 семействам (рис. 1–3).

Среди них продуктивные, с хорошим качеством древесины, устойчивые диплоидные и триплоидные гибриды тополя белого (*Populus alba* L.) и тополя сереющего (*Populus × canescens* Sm.); клоны продуктивных и гнилеустойчивых биотипов осины (*P. tremula* L.); продуктивных и засухоустойчивых форм березы повислой (*Betula pendula* L.) и березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.); форм карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti) с узорчатой

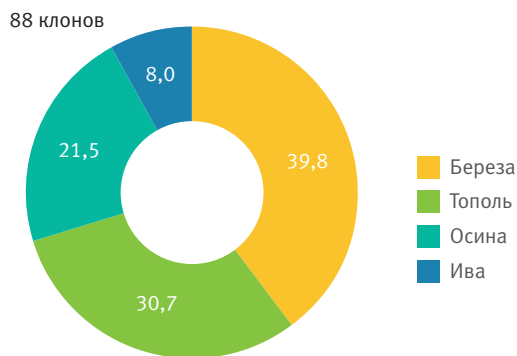


Рис. 1. Породный состав коллекции

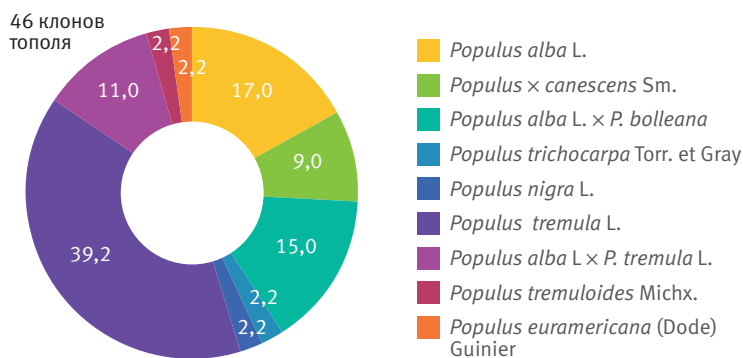


Рис. 2. Видовой состав коллекции (на примере тополя)



Рис. 3. Общий вид культур березы и тополя в коллекции длительного хранения (1–30 лет), 2022 г.

¹ [http://ckp-rf.ru/usu/569228./](http://ckp-rf.ru/usu/569228/)

текстурой древесины; декоративных рассеченно-листных форм березы далекарлийской (*B. pendula* "dalekarlica" (L.f.); быстрорастущих биотипов разных видов ивы (*Salix* spp.), перспективных для создания биоэнергетических плантаций. Причем более 60 % генотипов являются результатом биоизыскательской деятельности ученых ВНИИЛГИСБиотех, их нет ни в одной аналогичной коллекции России и мира. Большинство из них трудно размножается обычным черенкованием, а отдельные генотипы по разным причинам уже отсутствуют в природе [9]. В последние годы коллекция дополнена новыми клонами и линиями березы и тополя, устойчивыми к засолению питательной среды NaCl и Cd и полученными на основе клеточной и тканевой селекции *in vitro* [10].

Позднее коллекции *in vitro* были созданы в Институте леса Карельского научного центра РАН (ИЛ КарНЦ РАН, Петрозаводск) [11], Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Красноярск) [12] и филиале Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ РАН, Пушкино Московской обл.) [13]. В ИЛ КарНЦ РАН организована одна из самых крупных коллекций клонов карельской березы (семенного и вегетативного происхождения) и других редких видов сем. Betulaceae². В составе коллекции Института леса СО РАН хранятся клеточные линии, эмбриогенные культуры и растения-регенеранты *Larix sibirica* Ledeb. [12], а ФИБХ РАН – ценные генотипы березы и осины [13]. Коллекция ВНИИЛГИСБиотех отличается не только ассортиментом, но и условиями многолетнего поддержания клонов с использованием питательных сред без гормонов, которые впервые были применены нами для березы и тополя [8]. Такой подход снижает вероятность соматической изменчивости и способствует сохранению генетической и хозяйственной ценности образцов.

Цель работы – продемонстрировать методику формирования коллекции *in vitro* и возможности ее использования для сохранения, воспроизводства и изучения лесных генетических ресурсов.

Материалы и методы исследований

Формированию коллекции *in vitro* ценных генотипов лиственных древесных растений должны предшествовать исследования по разработке технологий клонального микроразмножения, которые предпочтительно осуществлять с использованием модели, основанной на пролиферации пазушных (или апикальных) меристем. Такие методы и технологии были ранее разработаны нами для разных видов, гибридов и генотипов березы [14], осины [15], тополя [16], ивы [17].

Для введения в культуру *in vitro* отбирали только хозяйственно ценные, уникальные экземпляры, как правило, трудночеренкуемые обычным способом. В Центрально-Черноземной области лучшим сроком заготовки побегов (8–10 шт. длиной 10–20 см с 6–7 вегетативными почками на каждом) со взрослых материнских деревьев для введения эксплантов в культуру *in vitro* являются: февраль – для березы (однолетние зимние одревесневшие побеги), май–июнь – для тополя, осины и ивы (однолетние растущие не одревесневшие (зеленые) побеги). Соблюдение указанных сроков позволяет получить до 80 % жизнеспособных первичных культур. Побеги с хорошо выраженными междоузлиями заготавливали преимущественно из верхнего яруса кроны (онтогенетически более "молодой" зоны возобновления), что повышало эффективность морфогенеза (до 50 % морфогенных культур).

Экспланты (стеблевые сегменты с одной пазушной почкой) отобранных деревьев однократно вводили в культуру *in vitro*, из них регенерировали (путем прямого органогенеза) микрорастения согласно разработанным методикам [8, 9, 18]. Для индукции побегов использовали питательные среды MS [19] или WPM [20], дополненные 6-бензиламинопурином (БАП) в концентрации 0,2–1,0 мг/л. Режим культивирования: температура – 25 ± 2 °С, фотопериод – 16 ч день / 8 ч ночь, освещенность – 2,0 клк. Для снижения вероятности возникновения соматической изменчивости применение гормональных сред

² [http://www.ckp-rf.ru/usu/465691./](http://www.ckp-rf.ru/usu/465691/)

ограничивали 1–3 пассажами культивирования первичных эксплантов. С этой же целью мультипликацию, укоренение микропобегов и многолетнее хранение клонов осуществляли на питательных средах (1/2 MS или 1/2 WPM) без гормонов. В этом случае происходило спонтанное укоренение микропобегов с формированием хорошо развитой корневой системы. Отметим, что большинство исследователей для этих целей применяют питательные среды с гормонами [21–23].

Живые образцы (микрорастения) поддерживали в виде пересадочной коллекции в условиях нормального (стандартные условия культивирования) или замедленного роста (при пониженной температуре) [9, 18]. При хранении в условиях нормального роста (25 °С, 2,0 клк, 16 ч день / 8 ч ночь) проводили редкое субкультивирование микрорастений с интервалом один раз в 4–6 мес. (против 1–2 мес. в норме), а при хранении при пониженной температуре (4 °С, 0,5 клк, 6 ч день / 18 ч ночь) – с более редким интервалом (до 12 мес). В последнем случае осуществляли резервное хранение (дублирование) части особо ценных коллекционных образцов. Для торможения ростовых процессов при стандартных условиях культивирования использовали уплотнение питательной среды путем увеличения концентрации агара (9 г/л вместо 6–7 г/л). В случае необходимости повышения сохранности культур при долгосрочном хранении в питательные среды добавляли активированный уголь (1,5–2 %) для адсорбции продуктов обмена и предотвращения изменения кислотности среды.

С целью снижения вероятности микробной контаминации культур и повышения их сохранности при долгосрочном хранении в качестве культуральных сосудов, использовали биологические пробирки (21×200 мм), в которые высаживали по одному микропобегу. Растения в этом случае хорошо развивались, имели выраженные междоузлия, что благоприятно для их микрочеренкования. Клонирование *in vitro* микрорастений проводили в стеклянных конических колбах объемом 150 мл, в которые высаживали по 3–5 эксплантов (одноузловых сегментов стебля).

Каждый клон в коллекции представлен не менее чем 20–30 образцами (микрорастениями)

и сопровождается паспортом. Паспорта включают детальные сведения об образце: регистрационный номер, таксономический статус объекта хранения, автор(ы) и год создания клона, характеристика материнского дерева (происхождение, место произрастания, оригинатор (или автор сбора материала), хозяйственная и селекционная ценность, условия культивирования *in vitro* (световой режим, питательная среда, периодичность пересадки, другие особенности), характеристика клона (морфологические, биотехнологические, молекулярно-генетические и другие особенности, его фотография), пloidность, результаты тестирования *in vitro* и *ex vitro*. Молекулярно-генетическая паспортизация (для идентификации образцов, а также защиты прав обладателей интеллектуальной собственности селекционных достижений) проводилась на основе микросателлитных маркеров. Следует отметить, что в работе с биоресурсными коллекциями микросателлитные маркеры широко используют для идентификации образцов разных культур [24, 25].

Основные функции коллекции:

- 1) сохранение и воспроизводство представителей ценного генофонда;
- 2) сокращение сроков выращивания и снижение себестоимости посадочного материала для создания лесных культур целевого назначения или восстановления генофонда редких и/или исчезающих видов;
- 3) исследования по клеточной и тканевой селекции для усовершенствования существующих и получения новых форм;
- 4) проведение методических, прикладных и фундаментальных исследований в области биотехнологии, генетики и селекции, в том числе изучение генетики морфогенеза с использованием созданных нами модельных объектов (уникальных соматоклональных вариантов).

Результаты и обсуждение

Тестирование коллекционного материала в ходе длительного культивирования *in vitro*. Для обеспечения основной функции коллекции

(консервация *ex situ* и воспроизводство ценных генотипов) нами периодически проводится тестирование коллекционного материала (оценка характеристик данного клона в процессе длительного хранения, его генетической стабильности и идентичности исходным экземплярам), которое осуществляется на основе биотехнологической оценки (*in vitro*), хромосомного анализа и ДНК-технологий, результатов полевых испытаний (*ex vitro*).

Установлено, что оба способа хранения (стандартные условия культивирования и условия замедленного роста – при пониженной температуре) обеспечивают высокие биотехнологические параметры, а также стабильно высокую сохранность (до 100 %) и регенерационную способность (укореняемость – 90–100 %, коэффициент мультипликации культур: 4,3–7,0 – для березы, 4,0–8,2 – для тополя и осины, 5,8–8,2 – для ивы). Так, например, на протяжении 30-летнего срока хранения при стандартных условиях культивирования клон Ia высокоствольной формы карельской березы отмечена высокая сохранность растений *in vitro* (82–97 %) и их приживаемость в теплице – *ex vitro* (75–96 %) (рис. 4). Сохраняются особенности роста клонов в высоту в условиях *in vitro* и *ex vitro*, их внутриклоновая однородность по росту, отсутствуют признаки соматоклональной изменчивости [18].

Хромосомный анализ показал, что коллекционные клоны разного срока хранения *in vitro*

демонстрируют идентичность материнским деревьям по плоидности (у березы – диплоиды $2n=28$, триплоиды $2n=42$ или тетраплоиды $2n=56$; у тополя и осины – диплоиды $2n=38$ или триплоиды $2n=57$) и уровню миксоплоидии. Так, клоны карельской березы Ia и Ю сохранили диплоидный ($2n=28$), а клон Зпш березы пушистой – тетраплоидный ($2n=56$) уровень плоидности, присущий их материнским деревьям (рис. 5). При этом содержание клеток с модальным (диплоидным или тетраплоидным) числом хромосом высокое (до 90 %), а незначительная часть (до 10 %) приходится на долю анеуплоидных клеток. Клон Тр карельской березы является выраженным миксоплоидом (как и его материнское дерево). Содержание триплоидных клеток ($2n=42$) в среднем составило 60 %, диплоидных ($2n=28$) – 30 %, анеуплоидных – 10 %. Причем такое соотношение сохранялось в течение всего периода хранения [9, 26].

Микросателлитный анализ коллекционных клонов березы, тополя и осины разной длительности хранения *in vitro*, находящихся в условиях *in vitro* и *ex vitro* (теплица, питомник), подтвердил их внутриклоновую генетическую однородность и стабильность (низкую мутабельность), а также идентичность материнским деревьям [9, 26].

Известно, что митохондриальная ДНК (мтДНК) и хлоропластная ДНК (хлДНК) более чувствительны к повреждающим факторам по сравнению с ядерной ДНК, что связывают

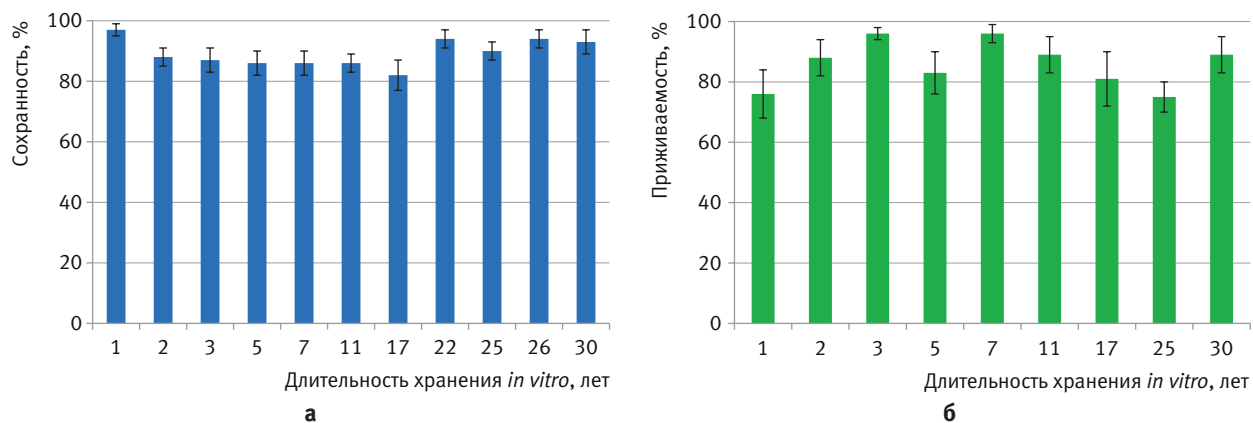


Рис. 4. Сохранность *in vitro* (а) и приживаемость *ex vitro* (б, в теплице) растений клона Ia карельской березы разного срока хранения *in vitro*, % общего числа высаженных микропобегов

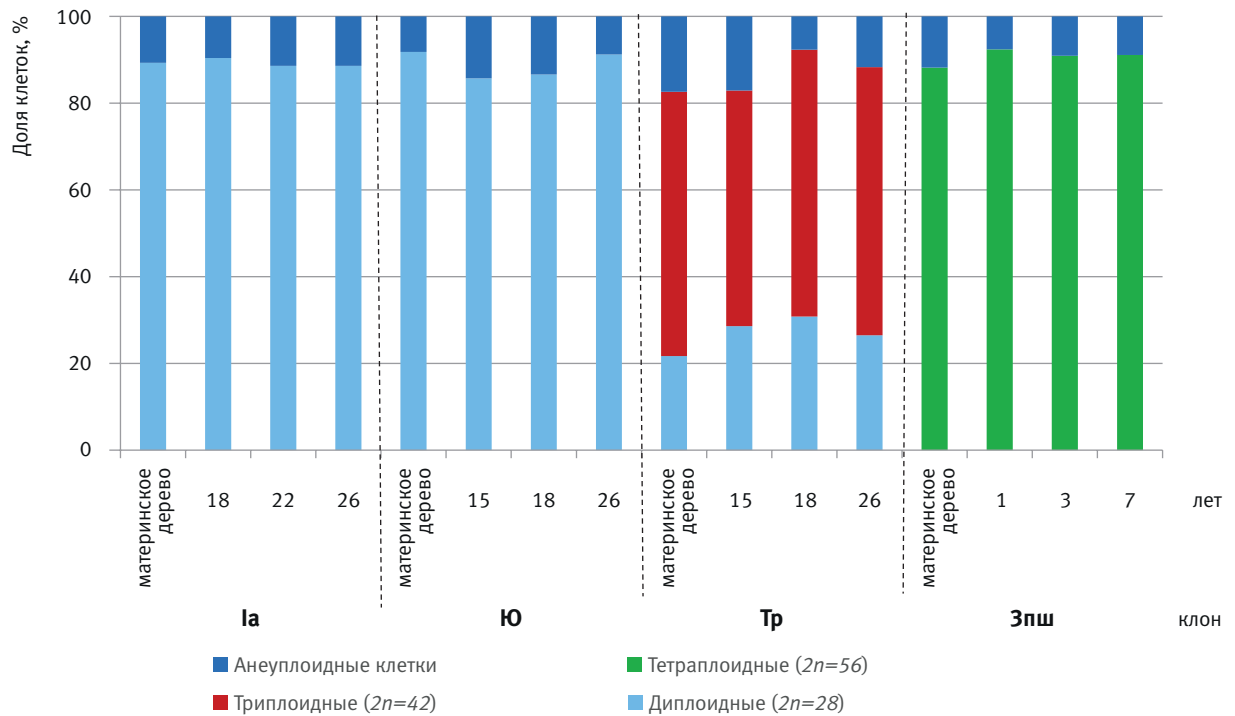


Рис. 5. Статус пloidности и соотношение клеток с различным числом хромосом в корневой меристеме растений клонов карельской березы (Ia, Ю, Тр) и березы пушистой (Зпш) в процессе длительного хранения *in vitro*.

с несовершенством у них систем репарации и отсутствием гистонов, а также прокариотической организацией генома. МтДНК локализована в матриксе митохондрий (т.е. в непосредственной близости с сайтами продукции активных форм кислорода – АФК) [27, 28].

Наши исследования выявили большее количество повреждений неядерной ДНК (мтДНК и хлДНК) у клонов тополя белого 26-летнего срока хранения по сравнению с 5-летними [29]. Накопление повреждений мтДНК и хлДНК с увеличением длительности хранения может приводить к нарушениям энергетического баланса, метаболизма, фотосинтеза, роста и развития. Однако у клонов 26-летнего срока хранения *in vitro* не обнаружены видимые признаки онтогенетического старения и соматоклональной изменчивости, изменения статуса пloidности; сохранился уровень экспрессии генов *ogg1* и *hrcs1*, отвечающих за репарацию ДНК, которая является адаптивной реакцией растительного организма на стресс. Это может быть связано с оптимальными условиями длительного хранения на питательных

средах без гормонов. Установлено, что мтДНК и хлДНК триплоидных клонов с возрастом накапливают меньше повреждений, чем диплоидные клоны. У триплоидов выявлено и более высокое содержание копий мтДНК, что может обеспечить их большую устойчивость к стрессовым условиям при высадке в грунт [29].

Выращивание посадочного материала и создание плантационных культур на основе коллекции *in vitro*. Выращивание посадочного материала на основе коллекции *in vitro* дает целый ряд преимуществ (по сравнению с традиционным черенкованием), среди которых – повышение эффективности выращивания качественного посадочного материала (за счет селективного, круглогодичного, массового тиражирования генотипов с заданными свойствами) для создания лесных культур целевого назначения, лесоразведения; снижение сроков и себестоимости получения посадочного материала за счет исключения достаточно трудоемких этапов введения эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации растений, упрощения этапа клонирования

in vitro (при применении безгормональных питательных сред).

Выращенный на основе коллекции *in vitro* посадочный материал лиственных древесных растений был использован нами для создания опытных плантационных культур (на площади более 2 га) карельской березы (5 клонов) и березы повислой (2 клон), тополя белого и тополя сереющего (6 клонов), осины (3 клон). Их возраст в настоящее время – 21–29 лет [9, 26]. Мы – одни из первых, кто предложил проводить непосредственную высадку микрорастений березы, тополя и осины из культуры *in vitro* сразу в нестерильный грунт теплицы (рис. 6), что также упрощает и удешевляет процесс выращивания посадочного материала. Полученный таким способом посадочный материал имел достаточно высокую приживаемость и сохранность *ex vitro* (теплица, лесной питомник) – 70–100 %.

Результаты экономических расчетов (на примере березы) показали, что использование коллекции живых образцов позволяет снизить расходы на выращивание посадочного материала (по сравнению с полным циклом его получения – от заготовки материала с дерева до выращивания растений в теплице). Себестоимость одного саженца березы пушистой, выращенного на основе коллекции *in vitro* (на июнь 2019 г.), составила 15,61 руб. (против 18,77 руб. по полному циклу). При проведении непосредственной высадки регенерантов (т.е. из культуры *in vitro* сразу в теплицу) себестоимость снизится на 25,8 % относительно технологии полного цикла (13,93 руб.) [30]. Конкурентным по цене является и создание плантационных культур на основе коллекции *in vitro*. Полная себестоимость создания 1 га плантации карельской березы посадочным материалом *in vitro* (при схеме посадки 3 × 6 м) составила 297 863,95 руб. По данным изучения конъюнктуры рынка посадочного материала (на июнь 2022 г.), минимальная цена на саженцы березы начинается от 100 руб./шт., тогда как производственная себестоимость одного саженца *in vitro* карельской березы с открытой корневой системой (ОКС) на выходе из теплицы составила 24,20 руб. [30].



Рис. 6. Непосредственная высадка растений березы в теплицу после длительного (25 лет) культивирования в условиях *in vitro*

Многолетние полевые испытания клонов после их длительного хранения *in vitro* демонстрируют хорошее состояние и высокую сохранность (75–97 %), поддержание специфических для их исходных генотипов особенностей роста и относительной внутриклоновой однородности, а также идентичности исходным экземплярам (по особенностям роста, габитусу, качеству древесины, плоидности и молекулярно-генетическим особенностям).

У разноплоидных (диплоидных и триплоидных) коллекционных клонов тополя и осины выявлена аналогичная динамика роста с исходными деревьями, достаточно высокая продуктивность древостоев. Так, в возрасте 19 лет средняя высота деревьев осины составила 18–20 м, диаметр ствола – 26–38 см, объем ствола – 0,423–0,931 м³, запас древесины – 117–383 м³/га. Триплоидный (2n=57) клон осины отличается наиболее высокой сохранностью (71,4 % против 65,8 % и 44,4 % у диплоидных клонов), наилучшими техническими свойствами древесины (по плотности и длине волокна), отсутствием признаков заболевания сердцевинной гнилью [26].

У клонов карельской березы каллусного происхождения (после 1, 5, 10 и 11 лет хранения *in vitro*) наблюдалось раннее (с 3–5 лет), полное

(у всех деревьев к 5–8-летнему возрасту) и хорошо выраженное проявление внешних и анатомических признаков узорчатости древесины (рис. 7). У растений, полученных по обычной технологии (семенным путем), признаки узорчатости проявлялись позже – в 10–12 лет. Выращивание карельской березы калусного происхождения позволит получать высококачественную древесину не только в массовом количестве, но и в более короткие сроки [9].

Коллекция *in vitro* как генетический ресурс для проведения прикладных и фундаментальных исследований. Коллекция *in vitro* – это не только стратегический резерв ценного генофонда нашей страны, но и генетический ресурс, а также модель для проведения прикладных и фундаментальных исследований в области лесной генетики, селекции и биотехнологии.

На основе коллекции *in vitro* нами выполняются исследования по клеточной и тканевой селекции для получения селекционно улучшенного посадочного материала березы и тополя, в частности толерантного к негативным факторам среды. Для лесных древесных растений эти вопросы остаются слабоизученными. Известно, что засоление питательных сред хлоридом натрия (NaCl) позволяет моделировать как солевой, так

и осмотический стресс, отбирать солеустойчивые и засухоустойчивые формы [31, 32]. Показана возможность использования кадмия (Cd), обладающего не только токсическим, но и осмотическим действием, в качестве осмотического стрессора для отбора *in vitro* устойчивых к водному дефициту вариантов [33, 34]. Это определило наш выбор стрессоров (NaCl, Cd) в исследованиях по тканевой и клеточной селекции.

Нами разработана схема селекции *in vitro* (на примере разных видов березы) на устойчивость к хлориду натрия (NaCl) (рис. 8). Она основана на использовании двух модельных биотест-систем: сначала коллекции клонов березы *in vitro* (культура микропобегов, тканевая селекция), а затем стеблевых калусных культур, полученных от наиболее устойчивых к засолению клонов, т.е. на генетическом разнообразии коллекции (виды, разновидности, полиплоиды, гибриды) и индуцированной клеточной гетерогенности калусных культур [10].

Данная схема может быть адаптирована для других стрессоров, пород и видов лиственных древесных растений.

По результатам испытания экспериментального материала березы *in vitro* и *ex vitro* (с использованием селективных сред *in vitro*

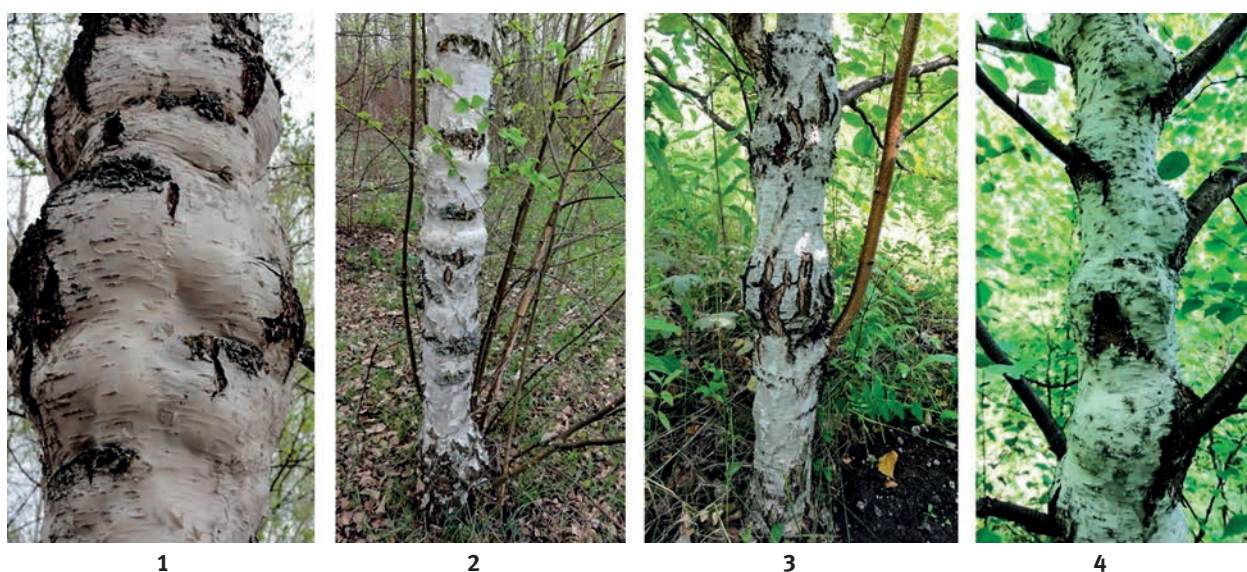


Рис. 7. Внешнее проявление признаков узорчатости древесины (хорошо выраженные вздутия на поверхности ствола) у деревьев карельской березы после 1 года (1), 5 лет (2), 10 (3) и 11 лет (4) хранения в коллекции *in vitro*. Семилукский лесной питомник, Воронежская обл.

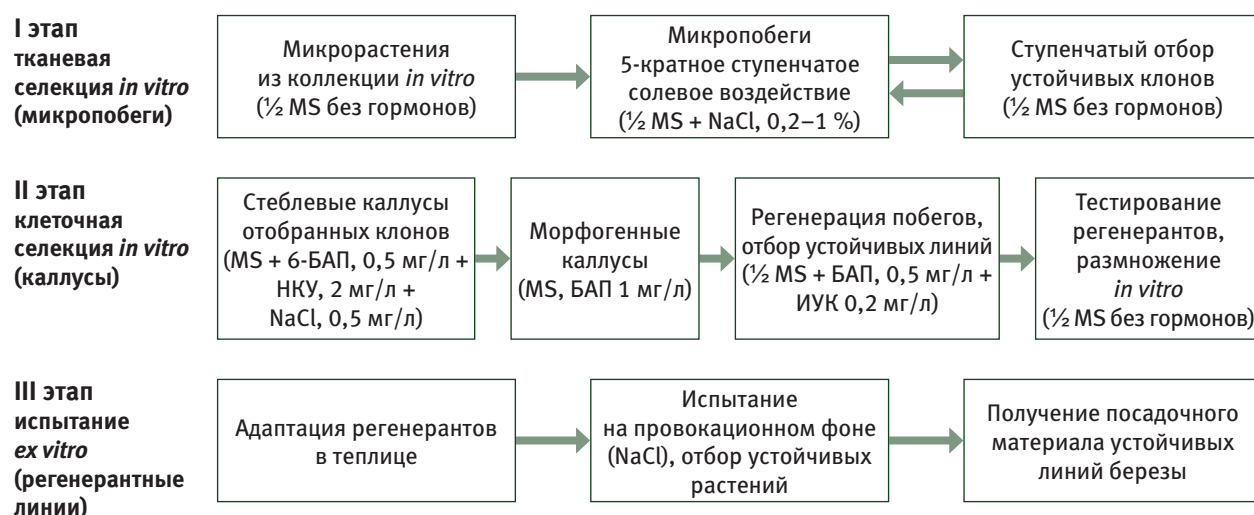


Рис. 8. СХЕМА СЕЛЕКЦИИ *IN VITRO* БЕРЕЗЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ [10]

и провокационного фона *ex vitro*) отобрано 7 наиболее устойчивых к засолению NaCl линий березы, из них 3 показали комплексную устойчивость (как к NaCl, так и к Cd).

Имеющиеся в коллекции оригинальные соматоклональные варианты березы являются удобными моделями для изучения генетики морфогенеза, механизмов соматоклональной изменчивости. Так, разработана модельная система, позволявшая выявить значительный вклад эпигеномных механизмов в морфогенез рассеченного листа березы под влиянием условий культивирования – гормонов (ауксина β -индолилуксусной кислоты) или эпимутагенов (5-азациитидина, никотиновой кислоты) [35]. Показана возможность получения на основе коллекции *in vitro* посадочного материала березы с гарантированным сохранением морфотипа с декоративными листьями.

Перспективы развития коллекции. Нерешенные проблемы. Коллекция ВНИИЛГИСбиотех развивается путем пополнения новыми образцами листовых древесных растений с расширением видового и породного состава. Так, в последние годы в рамках выполнения государственных заданий Федерального агентства лесного хозяйства здесь проводят исследования по изучению и разработке протоколов и технологических решений клонального микроразмножения экономически ценных генотипов

твердолиственных пород (дуба черешчатого и ясеня обыкновенного), разных видов клена и липы.

Развитие коллекции заключается и в расширении ее функций, в частности путем совершенствования биотехнологий: условий длительного хранения *in vitro*, методов селекции *in vitro* для получения улучшенного посадочного материала. Коллекцию предполагается использовать для развития генетических технологий (в том числе технологий генетического редактирования, выявления генетических маркеров, ассоциированных с селекционно значимыми признаками и др.). Важность проведения таких исследований определена Федеральной научно-технической программой развития генетических технологий на 2019–2027 гг. [4].

Отмечается, что, несмотря на существование в нашей стране достаточно большого количества биоресурсных коллекций (около 250 коллекций, различающихся по объектам и направлениям), до сих пор отсутствует единая информационная система, обеспечивающая доступ специалистов к информации о существующих в России коллекциях, унифицированный формат предоставления данных о составе коллекций (в соответствии с мировыми стандартами). Не отработан механизм взаимодействия биоресурсных коллекций по сетевому принципу [3, 6].

Так, например, до сих пор не сформированы единая стратегия и методики создания, регистрации, хранения и использования коллекций *in vitro* лесных древесных растений. Не определен перечень объектов (пород, видов, гибридов, сортов), подлежащих предпочтительному хранению в коллекции *in vitro*. Нередко коллекционные образцы длительно хранят в виде побегов без корней (а не полноценных растений) на питательных средах с гормонами цитокининовой природы, что затрудняет последующий этап их укоренения и может привести к соматической изменчивости. Исследователи используют разные подходы, протоколы и ДНК-маркеры для молекулярно-генетической паспортизации и идентификации образцов. Все это затрудняет тесное взаимодействие между организациями (НИИ, ботаническими садами, вузами), имеющими сходные типы коллекций.

В 2013 г. на базе ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» был создан «Центр лесных биотехнологий», одна из основных задач которого – поддержание работ по сохранению лесных генетических ресурсов, в том числе селекционных достижений. При участии членов экспертной рабочей группы (особенно д-ра биол. наук Л.В. Ветчинниковой) по направлению «Клональное микроразмножение» Межведомственного научно-координационного совета было разработано Положение о банке *in vitro* лесных древесных растений в структуре «Центра лесных биотехнологий»³. В нем представлены предложения и основные требования к формированию, длительному поддержанию, паспортизации и контролю коллекций лесных древесных растений. Положение было рассмотрено и утверждено на VII заседании Межведомственного научно-координационного совета «Центра лесных биотехнологий» (28 июня 2017 г., Москва, Рослесхоз). Следует отметить, что только 2 научных института-держателя (ВНИИЛГИСбиотех и ИЛ КарНЦ РАН) создали интернет-порталы с предоставлением доступной информации о поддерживаемых *in vitro* коллекциях лесных древесных растений⁴.

Решение этих вопросов будет способствовать повышению доступности и востребованности коллекций, расширению их функций за счет объединения усилий исследователей различных направлений (биотехнологов, генетиков, селекционеров и др.) в рамках сетевого взаимодействия, внедрению полученных результатов в практику лесного хозяйства.

Выводы

Показана возможность длительного надежного хранения *in vitro* (от 1 года до 30 лет) коллекционных образцов ценных генотипов березы, тополя, осины, ивы с использованием безгормональных питательных сред, которые обеспечивают высокую жизне- и регенерационную способность, возможность полноценного развития растений *in vitro* и *ex vitro* (в полевых условиях), а также сохранение генетических и селекционных особенностей материнских деревьев.

Использование *in vitro* коллекции существенно расширяет возможности сохранения (*ex situ* консервации) лесных генетических ресурсов. Выращивание посадочного материала на основе коллекций позволяет упростить отдельные этапы клонального микроразмножения, что снижает сроки его получения и себестоимость, повышает конкурентоспособность, способствует повышению эффективности получения качественных саженцев для создания лесных культур целевого назначения, воспроизводства быстрорастущих листовенных пород после пожаров, засухи, рубок, техногенного загрязнения.

Кроме того, коллекции *in vitro*, включающие уникальный генетически разнообразный материал лесных древесных растений, представляют особую ценность для проведения методических, прикладных и фундаментальных исследований в области биотехнологии, генетики и селекции.

³ <http://www.vniilgisbiotech.ru/index.php/tsentr-lesnykh-biotekhnologij?lang=ru>

⁴ <https://www.vniilgisbiotech.ru>; <http://forestry.krc.karelia.ru>

Список источников

1. Решетников, В.Н. Биотехнология растений и перспективы ее развития / В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович, А.М. Носов // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46. – № 1. – С. 3–17.
2. Молканова, О.И. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* / О.И. Молканова, Л.И. Коновалова, Т.С. Стахеева // Бюллетень ГНБС. – 2016. – № 120. – С. 17–23.
3. Хлесткина, Е.К. Генетические ресурсы России: от коллекций к биоресурсным центрам / Е.К. Хлесткина // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2022. – Т. 183. – № 1. – С. 9–30.
4. Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 годы. Постановление Правительства РФ от 22.04.2019 № 479 (с изм. от 28.08.2021).
5. Колчанов, Н.А. Биоресурсные коллекции институтов Министерства науки и высшего образования: опыт инвентаризации и развития / Н.А. Колчанов // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвящ. 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019). – Санкт-Петербург : ВВМ, 2019. – С. 399.
6. Информационная система по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России / С.А. Лашин, Д.А. Афонников, М.А. Генаев [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 386–393.
7. О Национальном центре генетических ресурсов растений. – Текст : электронный. – Указ Президента Российской Федерации от 08.02.2022 № 44. Официальный интернет-портал правовой информации. – Режим доступа: URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202202080014> [дата обращения: 16.02.2023].
8. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, Л.М. Стародубцева // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 950–953.
9. Табацкая, Т.М. Опыт долговременного хранения коллекции ценных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред / Т.М. Табацкая, О.С. Машкина // Лесоведение. – 2020. – № 2. – С. 147–161.
10. Mashkina, O.S. *In vitro* selection of birch for tolerance to salinity stress / O.S. Mashkina, T.M. Tabatskaya, O.M. Korchagin // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – P. 13. – 875(1): 012082. DOI:10.1088/1755-1315/875/1/012082.
11. Ветчинникова, Л.В. Карельская береза: важнейшие результаты и перспективы исследований / Л.В. Ветчинникова, А.Ф. Титов. – Петрозаводск : КарНЦ РАН, 2021. – 243 с.
12. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro* / И.Н. Третьякова, М.Э. Пак, А.С. Иваницкая [и др.] // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 6. – С. 812–822.
13. Vidyagina, E.O. Long-term of different aspen genotypes *in vitro* without repotting / E.O. Vidyagina, M.V. Filippov, K.A. Shestibratov // Plant cell biology *in vitro* and biotechnology : Proc. Conf. – Kazan (October 14–18). – 2013. – 274 p.
14. Способ микроклонального размножения карельской березы / Г.П. Бутова, Т.М. Табацкая, Л.Л. Скробова. – А.с. SU 1597386 A1. – Опубл. 07.10.1990. – Бюл. № 37.
15. Машкина, О.С. Микроклональное размножение хозяйственно ценных генотипов осины / О.С. Машкина, Ю.Н. Исаков // Сохранение, изучение и воспроизводство генетических ресурсов лесных древесных растений. – Воронеж, 2007. – С. 47–58.
16. Шабанова, Е.А. Клональное микроразмножение хозяйственно-ценных форм тополя / Е.А. Шабанова, О.С. Машкина // Лесохозяйственная информация. – 2015. – № 4. – С. 74–81.
17. Метод клонального микроразмножения различных видов и гибридов ивы / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, А.И. Горобец [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 1. – С. 51–59.

18. Машкина, О.С. Технология долгосрочного хранения в культуре *in vitro* ценных генотипов березы и выращивание на ее основе посадочного материала / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, Н.И. Внукова // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 3. – С. 57–67.
19. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.
20. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. McCown // *Plant Propagators Soc. Comb. Proc.* – 1980. – № 30. – P. 421–427.
21. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) / P. Smykal, L. Valledor, R. Rodriguez [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2007. – V. 26. – № 11. – P. 1985–1998.
22. Концевая, И.И. Длительное хранение микрорастений березы в культуре тканей / И.И. Концевая // Лесоведение. – 2009. – № 5. – С. 50–56.
23. Егорова, Н.А. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. / Н.А. Егорова, О.В. Якимова // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2019. – № 47. – С. 22–39
24. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4–2. – С. 1044–1054.
25. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля, выведенные селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка» / Н.С. Клименко, Т.А. Гавриленко, И.Г. Чухина [и др.] // Биотехнология и селекция растений. – 2020. – Т. 3. – № 3. – P. 18–54.
26. Полевые испытания размноженных *in vitro* клонов осины (*Populus tremula* L.): рост, продуктивность, качество древесины, генетическая стабильность / О.С. Машкина, Е.А. Шабанова, И.Н. Вариводина [и др.] // Лесной журнал. – 2019. – № 6. – С. 25–38.
27. Herrero, A. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat / A. Herrero, G. Barja // *Age*. – 2001. – № 24. – P. 45–50.
28. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors / A.P. Gureev, E.A. Shafarostova, A.A. Starkov [et al.] // *Toxicology*. – 2017. – V. 382. – P. 67–74.
29. Study of the amount of oxidative damage to mitochondrial and chloroplast DNA in clones of white poplar (*Populus alba* L.) during long-term *in vitro* cultivation for 26 years / A.P. Gureev, O.S. Mashkina, E.A. Shabanova [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2021. – Vol. 106. – № 6. – P. 479–489.
30. Результат экономических исследований по выращиванию посадочного материала древесных лиственных культур и созданию плантаций с использованием методов биотехнологии / Н.И. Животягина, О.С. Машкина, Т.М. Табацкая [и др.] // Актуальные проблемы гуманитарных и социально-экономических наук. – 2022. – № 4 (93). – С. 3–8.
31. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress / M.K. Rai, R.K. Kalia, R. Singh [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 71. – № 1. – P. 89–98.
32. Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress / R. Munns // *Plant, Soil and Environment*. – 2002. – № 25. – P. 239–250.
33. Ветчинникова, Л.В. Влияние кадмия на морфо- и органогенез березы *in vitro* / Л.В. Ветчинникова, Т.Ю. Кузнецова, А.Ф. Титов // Труды Карельского научного центра РАН. – 2014. – № 5. – С. 174–181.
34. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для отбора форм пшеницы и кукурузы, устойчивых к осмотическим стрессам / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т. 22. – С. 318–322.
35. Машкина, О.С. Морфогенез рассеченного листа березы в культуре *in vitro* / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая // Онтогенез. – 2020. – Т. 51. – № 6. – С. 460–472.

References

1. Reshetnikov, V.N. Biotekhnologiya rastenij i perspektivy ee razvitiya / V.N. Reshetnikov, E.V. Spiridovich, A.M. Nosov // Fiziologiya rastenij i genetika. – 2014. – T. 46. – № 1. – S. 3–17.
2. Molkanova, O.I. Osobennosti razmnozheniya i sohraneniya kollekcii cennyh i redkih vidov rastenij v usloviyah in vitro / O.I. Molkanova, L.I. Konovalova, T.S. Staheeva // Byulleten' GNBS. – 2016. – № 120. – S. 17–23.
3. Hlestkina, E.K. Geneticheskie resursy Rossii: ot kollekcij k bioresurnym centram / E.K. Hlestkina // Trudy po prikladnoj botanike, genetike i selekcii. – 2022. – T. 183. – № 1. – S. 9–30.
4. Federal'naya nauchno-tehnicheskaya programma razvitiya geneticheskikh tekhnologij na 2019–2027 gody. Postanovlenie Pravitel'stva RF ot 22.04.2019 № 479 (s izm. ot 28.08.2021).
5. Kolchanov, N.A. Bioresursnye kollekcii institutov Ministerstva nauki i vysshego obrazovaniya: opyt inventarizacii i razvitiya / N.A. Kolchanov // VII S"ezd Vavilovskogo obshchestva genetikov i selekcionerov, posvyashch. 100-letiyu kafedry genetiki SPbGU, i associirovannye simpoziumy (Sankt-Peterburg, 18–22 iyunya 2019). – Sankt-Peterburg : VVM, 2019. – S. 399.
6. Informacionnaya sistema po bioresurnym kollekcijam institutov FANO Rossii / S.A. Lashin, D.A. Afonnikov, M.A. Genaev [i dr.] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. – 2018. – T. 22. – № 3. – S. 386–393.
7. O Nacional'nom centre geneticheskikh resursov rastenij. – Tekst : elektronnyj. – Ukaz Prezidenta Rossijskoj Federacii ot 08.02.2022 № 44. Oficial'nyj internet-portal pravovoj informacii. – Rezhim dostupa: URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202202080014> [data obrashcheniya: 16.02.2023].
8. Dlitel'noe mikrocherenkovanie dlya massovogo klonal'nogo razmnozheniya karel'skoj berezy i topolya / O.S. Mashkina, T.M. Tabackaya, L.M. Starodubceva // Fiziologiya rastenij. – 1999. – T. 46. – № 6. – S. 950–953.
9. Tabackaya, T.M. Opyt dolgovremennogo hraneniya kollekcii cennyh genotipov berezy s ispol'zovaniem bezgormonal'nyh pitatel'nyh sred / T.M. Tabackaya, O.S. Mashkina // Lesovedenie. – 2020. – № 2. – S. 147–161.
10. Mashkina, O.S. *In vitro* selection of birch for tolerance to salinity stress / O.S. Mashkina, T.M. Tabatskaya, O.M. Korchagin // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – P. 13 – 875(1): 012082. DOI:10.1088/1755-1315/875/1/012082.
11. Vetchinnikova, L.V. Karel'skaya bereza: vazhnejshie rezul'taty i perspektivy issledovanij / L.V. Vetchinnikova, A.F. Titov. – Petrozavodsk : KarNC RAN, 2021. – 243 s.
12. Osobennosti somaticheskogo embriogeneza dlitel'no proliferiruyushchih embriogennyh kletochnyh linij *Larix sibirica in vitro* / I.N. Tretyakova, M.E. Pak, A.S. Ivanickaya [i dr.] // Fiziologiya rastenij. – 2016. – T. 63. – № 6. – S. 812–822.
13. Vidyagina, E.O. Long-term of different aspen genotypes *in vitro* without repotting / E.O. Vidyagina, M.V. Filippov, K.A. Shestibratov // Plant cell biology in vitro and biotechnology : Proc. Conf. – Kazan (October 14–18). – 2013. – 274 p.
14. Sposob mikroklonal'nogo razmnozheniya karel'skoj berezy / G.P. Butova, T.M. Tabackaya, L.L. Skrobova. – A.s. SU 1597386 A1. – Opubl. 07.10.1990. – Byul. № 37.
15. Mashkina, O.S. Mikroklonal'noe razmnozhenie hozyajstvenno cennyh genotipov osiny / O.S. Mashkina, Yu.N. Isakov // Sohranenie, izuchenie i vosproizvodstvo geneticheskikh resursov lesnyh drevesnyh rastenij. – Voronezh, 2007. – S. 47–58.
16. Shabanova, E.A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie hozyajstvenno-cennyh form topolya / E.A. Shabanova, O.S. Mashkina // Lesohozyajstvennaya informaciy. – 2015. – № 4. – S. 74–81.
17. Metod klonal'nogo mikrorazmnozheniya razlichnyh vidov i gibridov ivy / O.S. Mashkina, T.M. Tabackaya, A.I. Gorobec [i dr.] // Biotekhnologiya. – 2010. – № 1. – S. 51–59.
18. Mashkina, O.S. Tekhnologiya dolgosrochnogo hraneniya v kul'ture *in vitro* cennyh genotipov berezy i vyrashchivanie na ee osnove posadochnogo materiala / O.S. Mashkina, T.M. Tabackaya, N.I. Vnukova // Biotekhnologiya. – 2019. – T. 35. – № 3. – S. 57–67.

19. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – R. 473–497.
20. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. McCown // *Plant Propagators Soc. Comb. Proc.* – 1980. – № 30. – P. 421–427.
21. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) / P. Smykal, L. Valledor, R. Rodriguez [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2007. – V. 26. – № 11. – R. 1985–1998.
22. Koncevaya, I.I. Dlitel'noe hranenie mikrorastenij berezy v kul'ture tkanej / I.I. Koncevaya // *Lesovedenie*. – 2009. – № 5. – S. 50–56.
23. Egorova, N.A. Vliyanie dlitel'nogo subkul'tivirovaniya na klonal'noe mikrorazmnozhenie *Melissa officinalis* L. i *Origanum vulgare* L. / N.A. Egorova, O.V. Yakimova // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. – 2019. – № 47. – S. 22–39
24. Hlestkina, E.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyah i v selekcii / E.K. Hlestkina // *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. – 2013. – T. 17. – № 4–2. – S. 1044–1054.
25. Nomenklaturnye standarty i geneticheskie pasporta sortov kartofelya, vyvedennye selekcionerami Leningradskogo NIISKH «Belogorka» / N.S. Klimenko, T.A. Gavrilenko, I.G. Chuhina [i dr.] // *Biotekhnologiya i selekciya rastenij*. – 2020. – T. 3. – № 3. – R. 18–54.
26. Polevye ispytaniya razmnozhenykh *in vitro* klonov osiny (*Populus tremula* L.): rost, produktivnost', kachestvo drevesiny, geneticheskaya stabil'nost' / O.S. Mashkina, E.A. Shabanova, I.N. Varivodina [i dr.] // *Lesnoj zhurnal*. – 2019. – № 6. – S. 25–38.
27. Herrero, A. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat / A. Herrero, G. Barja // *Age*. – 2001. – № 24. – R. 45–50.
28. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors / A.P. Gureev, E.A. Shafarostova, A.A. Starkov [et al.] // *Toxicology*. – 2017. – V. 382. – R. 67–74.
29. Study of the amount of oxidative damage to mitochondrial and chloroplast DNA in clones of white poplar (*Populus alba* L.) during long-term *in vitro* cultivation for 26 years / A.P. Gureev, O.S. Mashkina, E.A. Shabanova [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2021. – Vol. 106. – № 6. – P. 479–489.
30. Rezul'tat ekonomicheskikh issledovanij po vyrashchivaniyu posadochnogo materiala drevesnykh listvennykh kul'tur i sozdaniyu plantacij s ispol'zovaniem metodov biotekhnologii / N.I. Zhivotyagina, O.S. Mashkina, T.M. Tabackaya [i dr.] // *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i social'no-ekonomicheskikh nauk*. – 2022. – № 4 (93). – S. 3–8.
31. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress / M.K. Rai, R.K. Kalia, R. Singh [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 71. – № 1. – R. 89–98.
32. Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress / R. Munns // *Plant, Sell and Environment*. – 2002. – № 25. – P. 239–250.
33. Vetchinnikova, L.V. Vliyanie kadmiya na morfo- i organogenez berezy *in vitro* / L.V. Vetchinnikova, T.Yu. Kuznecova, A.F. Titov // *Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN*. – 2014. – № 5. – S. 174–181.
34. Sergeeva, L.E. Kletochnaya selekciya s ionami tyazhelykh metallov dlya otbora form pshenicy i kukuruzy, ustojchivykh k osmoticheskim stressam / L.E. Sergeeva, L.I. Bronnikova // *Faktori eksperimental'noi evolyucii organizmiv*. – 2018. – T. 22. – S. 318–322.
35. Mashkina, O.S. Morfogenez rassechennogo lista berezy v kul'ture *in vitro* / O.S. Mashkina, T.M. Tabackaya // *Ontogenez*. – 2020. – T. 51. – № 6. – S. 460–472.